

09/868338

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 04 JAN 2000

WIPO PCT

JP99/7079

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年12月18日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第360621号

出 願 人

Applicant (s):

味の素株式会社

PRIORITY

DOCUMENT

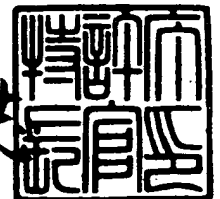
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月11日

特許庁長官

Commissioner,
Patent Office

山 建 志



出証番号 出証特平11-3037823

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-6003

【提出日】 平成10年12月18日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 A B Cトランスポーター及びそれをコードする遺伝子

【請求項の数】 11

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 菅野 壮平

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 木村 英一郎

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 松井 和彦

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 中松 亘

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ABCトランスポーター及びそれをコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(A)又は(B)に示すタンパク質。

(A) 配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

【請求項2】 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA

(A) 配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

【請求項3】 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項2記載のDNA。

(a) 配列表の配列番号7の塩基番号1～1101からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列表の配列番号7の塩基番号1～1101からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質をコードするDNA。

【請求項4】 下記(C)又は(D)に示すタンパク質。

(C) 配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、ABCトランスポーターのATPase活性を有するタンパク質。

【請求項5】 下記(C)又は(D)に示すタンパク質をコードするDNA

(C) 配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターのATPase活性を有するタンパク質。

【請求項6】 下記(c)又は(d)に示すDNAである請求項5記載のDNA。

(c) 配列表の配列番号7の塩基番号1117～1725からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列表の配列番号7の塩基番号1117～1725からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ABCトランスポーターのATPase活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項7】 下記(E)又は(F)に示すタンパク質。

(E) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

【請求項8】 下記(E)又は(F)に示すタンパク質をコードするDNA。

(E) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

【請求項9】 下記(e)又は(f)に示すDNAである請求項2記載のDNA。

(e) 配列表の配列番号7の塩基番号1759～2367からなる塩基配列を含むDNA。

(f) 配列表の配列番号7の塩基番号1759～2367からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質をコードするDNA。

【請求項10】 配列番号8記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコー

とする塩基配列と、配列番号9記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列と、配列番号10記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列とを含むDNA。

【請求項11】 配列番号7記載の塩基配列を有する請求項10記載のDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なABCトランスポーター及びその構成成分であるタンパク質をコードする遺伝子に関する。該遺伝子は、アミノ酸の細胞膜輸送が改変された微生物の育種等に利用することができる。

【0002】

【従来の技術】

アミノ酸やイオン等の物質が細胞膜を透過するための機構としていくつか知られているが、その一つとしてATP結合カセット (ATP binding cassette) スーパーファミリー (ABCトランスポーター) が知られている (C. F. Higgins, Ann. Rev. Cell Biol., 8, 67 (1992))。

【0003】

ATP結合カセットは、膜貫通ドメインを含むATP結合ドメインを有する一群のタンパク質であり、その生理的機能は主として物質の細胞内への取り込みであるが、物質の排出にもある程度関与していると考えられている。細菌では多くの場合、膜タンパク質 (膜成分)、膜の内側にありATPase活性を有するタンパク質、及び膜の外側にあり輸送される物質に結合する結合タンパク質を構成成分として含んでおり、膜タンパク質とATPase活性を有するタンパク質は多量体複合体を形成している。尚、物質の排出システムは、輸送される物質に結合する結合タンパク質を欠いているといわれている (Reizer, J. et al., Prot. Sci. 1, 1326 (1992))。

【0004】

ABCトランスポーター又はその構成成分は物質の輸送に関与しているため、

これらの遺伝子の発現を改変することによって、細胞の物質輸送に関する特性を改変させることができると考えられる。

【0005】

エシェリヒア・コリ等の細菌では種々のABCトランスポーター遺伝子の構造が解析され、ABCトランスポーターの構成成分をコードする各遺伝子は、オペロンを形成していることが知られている。しかし、コリネ型細菌ではアミノ酸の膜輸送に関するABCトランスポーターやその構成成分をコードする遺伝子は未知のものが多い。

【0006】

【発明の概要】

本発明者は、コリネ型L-グルタミン酸生産菌の育種を目的として、L-グルタミン酸生合成経路のうちの一つに関与する酵素グルタミン-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼ（グルタミン酸シンターゼとも呼ばれる。以下「GOGAT」と略す）をコードする遺伝子をクローニングした。その過程において、GOGATをコードする遺伝子（gltBD）を含むDNA断片が、アミノ酸の輸送に関わると考えられるABCトランスポーターをコードする遺伝子を含むことを偶然見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち本発明は、ABCトランスポーターの構成成分であるタンパク質、及びそれらをコードするDNAである。

【0008】

本発明のABCトランスポーターの第1の構成成分は、下記（A）又は（B）に示すタンパク質である。

（A）配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（B）配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

【0009】

本発明のABCトランスポーターの第2の構成成分は、下記（C）又は（D）

に示すタンパク質である。

(C) 配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、ABCトランスポーターのATPase活性を有するタンパク質。

【0010】

本発明のABCトランスポーターの第3の構成成分は、下記(E)又は(F)に示すタンパク質である。

(E) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

【0011】

本発明はまた、上記ABCトランスポーターの各構成成分であるタンパク質をコードするDNAを提供する。

さらに本発明は、ABCトランスポーターをコードするオペロンを提供する。

【0012】

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のDNAは、ブレバクテリウム・ラクトファーマンタムからgltd遺伝子の近傍に存在するORFとして見いだされたものであり、次のようにして取得することができる。

【0014】

ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム、例えばブレバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869の染色体DNAを鋳型とし、エシェリヒア・コリK-12 (Gene、第60巻、1~11頁、1987年) 及び酵母 (サッカロマイセス・セレビシエ、GenBank accession No.X89221) のgltd遺伝子間で相同性の高い領域の塩基配列、例えば配列表の配列番号1に示す塩基配列を有

するプライマー及び配列表の配列番号 2 に示す塩基配列を有するプライマーを用いた PCR (ポリメラーゼ・チェイン・リアクション) により、約 1.4 kb の DNA 断片を取得する。ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869 は、ATCC (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection): アメリカ合衆国、メリーランド 20852、ロックビル、パークローンドライブ 10301) から入手することができる。

【0015】

次に、上記のようにして得られる PCR 増幅断片をプローブとし、ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869 の染色体 DNA ライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションを行い、前記プローブにハイブリダイズする DNA 断片を取得することにより、gltBD 遺伝子とともに本発明の DNA を取得することができる。染色体 DNA ライブラリーの調製に、HindIII で切断した染色体 DNA を用いると、上記 DNA 断片は約 1.4 kb の大きさを持つ断片として得ることができる。

【0016】

上記の DNA 断片には gltBD 遺伝子が含まれ、その下流には、末端から gltBD 遺伝子と逆向きに 2 つのオープンリーディングフレーム (ORF) が存在する。これらの ORF は、配列番号 7 に示す塩基配列に含まれる ORF のうち、2 番目及び 3 番目の ORF にそれぞれ相当する。

【0017】

後記実施例に示すように、上記 2 つの ORF は、これらの上流に存在する他の一つの ORF とともに、オペロンを形成している可能性がある。この ORF は、配列番号 7 に示す塩基配列に含まれる ORF のうち 1 番目の ORF に相当する。この 1 番目の ORF は、ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム、例えばブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869 の染色体 DNA を鋳型とし、配列表の配列番号 5 に示す塩基配列を有するプライマー及び配列表の配列番号 6 に示す塩基配列を有するプライマーを用いた PCR により、約 1.8 kb の DNA 断片として取得することができる。この DNA 断片には、目的とする ORF の上流に、プロモーター領域と推定される領域が存在する。

【0018】

配列番号7に示した塩基配列は、上記の約14 kbのDNA断片中の塩基配列(1.3 kb)と、約1.8 kbのDNA断片中の塩基配列(1.1 kb)を連結したものである。

【0019】

上記の各ORFは、その塩基配列及び隣接する領域の塩基配列が明らかになったので、それらの塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いたPCRによっても、取得することができる。

【0020】

染色体DNAの調製、染色体DNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.21 (1989)等に記載されている。

【0021】

上記の第二のORF及びそれによってコードされるアミノ酸配列について、既知の配列と相同性比較を行った。用いたデータベースは、EMBLおよびSWISS-PROTである。その結果、これらの配列は、表1に示す既に報告されているアミノ酸の輸送を司るABCトランスポーターを構成するATPaseタンパク質及びそれをコードする遺伝子と相同性が認められた。これを含む3つのORFはオペロンを形成している可能性がある。

【0022】

【表1】

表1

遺伝子	輸送物質	由来	文献	相同性
artP	744 ⁺ ニン	E. coli	J. Bacteriol. 175:3687-3688(1993)	31.0%
artP	744 ⁺ ニン	Haemophilus influenzae	Science 269:496-512(1995)	31.8%
glnQ	グルタミン	Bacillus stearothermophilus	J. Bacteriol. 173:4877-4888(1991)	35.4%
glnQ	グルタミン	E. coli	Mol. Gen. Genet. 205:260-269(1986)	33.5%
gltL	グルタミン酸/ アスパラギン酸	E. coli	GeneBank Accession No. U10981	33.5%
gltL	グルタミン酸/ アスパラギン酸	Haemophilus influenzae	Science 262:496-512(1995)	31.2%
gluA	グルタミン酸	Corynebacterium glutamicum	J. Bacteriol. 177:1152-1158	34.4%
hisP	ヒスチジン	E. coli	Nature 298:723-727(1982)	33.0%
hisP	ヒスチジン	Salmonella typhimurium	Nucleic acids Res. 15:8568-8568	34.4%

【0023】

本発明のABCトランスポーターの構成成分をコードする遺伝子は、コードされる各タンパク質の特性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むATP結合タンパク質をコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なる。それは、イソロイシンとバリンのように、アミノ酸によっては、類縁性の高いアミノ酸が存在し、そのようなアミノ酸の違いが、蛋白質の立体構造に大きな影響を与えないことに由来する。

【0024】

上記のようなABCトランスポーターの構成成分と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、各タンパク質をコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及び各々のタンパク質をコードするDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0025】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、各構成成分を保持する微生物の個体差、種や属の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) も含まれる。

【0026】

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物の性質を調べることにより、ABCトランスポーターの構成成分と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有する各タンパク質をコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば、ATPaseにあっては、配列番号7の塩基番号1117~1725からなる塩基配列を有するDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、各構成成分の特性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、ABCトランスポーターの構成成分と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイ

ブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0027】

このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターを用いて発現産物の特性を調べることであり、容易に取り除くことができる。

【0028】

本発明のABCトランスポーターの構成成分をコードするDNA及びABCトランスポーターのオペロン（以下、これらを単に「本発明の遺伝子」ということがある）は、コリネ型細菌の育種に利用することができる。すなわち、本発明のABCトランスポーター又はその構成成分は、アミノ酸の輸送に関与していると考えられるため、これらの遺伝子の発現を改変することによって、細胞のアミノ酸輸送に関する特性を改変させることができると考えられる。

【0029】

本発明を適用し得るコリネ型細菌は、従来ブレヴィバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み（Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)）、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレヴィバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

【0030】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・アルカノリティカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム（コリネバクテリウム・グルタミカム）

コリネバクテリウム・メラセコーラ

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス
 コリネバクテリウム・ハーキュリス
 ブレバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
 ブレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
 ブレバクテリウム・インマリオフィラム
 ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
 ブレバクテリウム・ロゼウム
 ブレバクテリウム・サッカロリティカム
 ブレバクテリウム・チオゲニタリス
 ブレバクテリウム・アルバム
 ブレバクテリウム・セリヌム
 ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

[0031]

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870
 コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806
 コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC21511
 コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991
 コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020、13032、13060
 コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC15990
 コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965
 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340 (FERM BP-1539)
 コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868
 ブレバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14020

ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13826、ATCC14067

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068

ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13665、ATCC13869、

ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC13825

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240

ブレビバクテリウム・アルバム ATCC15111

ブレビバクテリウム・セリヌム ATCC15112

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC15354

【0032】

ABCトランスポーター又はその構成成分をコードする遺伝子を改変する方法としては、これらの遺伝子の増幅又は破壊が挙げられる。遺伝子等の増幅は、遺伝子をプラスミド等のベクターに連結して得られる組換えベクターでコリネ型細菌を形質転換することによって行うことができる。その際、マルチコピー型のベクターを用いることによって、増幅の効率を高めることができる。そのようなベクターとしては、コリネ型細菌で自律複製出来るプラスミド、例えば以下のものが挙げられる。

【0033】

pAM 330	特開昭58-67699号公報参照
pHM 1519	特開昭58-77895号公報参照
pAJ 655	特開昭58-192900号公報参照
pAJ 611	同 上
pAJ 1844	同 上
pCG 1	特開昭57-134500号公報参照
pCG 2	特開昭58-35197号公報参照
pCG 4	特開昭57-183799号公報参照
pCG 11	同 上

【0034】

コリネ型細菌の形質転換は、電気パルス法（特開平2-207791号公報参照）により行うことができる。

【0035】

遺伝子の増幅は、本発明の遺伝子を上記宿主の染色体DNA上に多コピー存在させることによって達成できる。コリネ型細菌の染色体DNA上に目的とする遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う（Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196(1985)）。また、染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、目的遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。

【0036】

また、染色体上にもともと存在する遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なもの又は機能の弱いものに置換することによっても、該遺伝子の発現を改変させることができる。

【0037】

一方、遺伝子の破壊は、相同組換えによる遺伝子破壊法が既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性プラスミドを用いる方法などによって、行うことができる。

【0038】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0039】

(1) プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869のgltBD遺伝子のクローニング

大腸菌と酵母のgltB遺伝子産物間でアミノ酸配列の相同性の高い領域を選

び、その配列から塩基配列を推定し、配列番号1および配列番号2に示すオリゴヌクレオチドを合成した。一方、Bacterial Genomic DNA Purification Kit (Advanced Genetic Technologies Corp.製)を用いて、ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム ATCC 13869の染色体DNAを調製した。この染色体DNAを鋳型とし、前記オリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、PCRテクノロジー (ヘンリーエーリッヒ編、ストックトンプレス、1989年) 8頁に記載されている標準反応条件でPCRを行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動したところ、約1.4キロベースのDNA断片が増幅されていることが判明した。

【0040】

得られたDNAは、配列番号1および配列番号2に示すオリゴヌクレオチドを用いて両端の塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、DNA Sequencing Kit (Applied Biosystems社製)を用いてSangerの方法 (J. Mol. Biol., 143, 161 (1980))に従って行った。決定された塩基配列をアミノ酸配列に翻訳して、大腸菌と酵母のgltB遺伝子から予想されるアミノ酸配列と比較したところ、相溶性が高かったので、PCRにより増幅したDNA断片はブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム ATCC 13869のgltB遺伝子の一部であると判断した。このPCR増幅DNA断片をプローブとし、上記の方法で調製したブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム ATCC 13869の染色体DNAを定法によりEcoRI、BamHI、HindIII、PstI、SalI (宝酒造社製)で切断した断片について、DIG DNA Labeling and Detection Kit (ペーリンガー・マンハイム社製)を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、HindIIIで切断された約1.4キロベースの切断断片がプローブDNAとハイブリダイズすることが判明した。

【0041】

そこで、定法により調製したブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム ATCC 13869染色体DNAのHindIII断片をアガロース電気泳動し、約10キロベース以上のDNA断片をガラスパウダーを用いて回収し、回収されたDNA断片と制限酵素HindIII (宝酒造社製)で切断したベクターpMW219 (ニッポンジーン製)

はライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結し、エシェリヒア・コリJ M109のコンピテントセル（宝酒造社製）を用いて形質転換を行った。形質転換株をIPTG（イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド）10 μg/ml、X-Gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド）40 μg/ml及びカナマイシン25 μg/mlを含むL培地（バクトトリプトン10 g/l、バクトイーストエキストラクト5 g/l、NaCl 5 g/l、寒天15 g/l、pH 7.2）に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、約1,000個の形質転換体を得た。

【0042】

得られた形質転換体は、アルカリ法（生物学実験書、日本生物工学会編、1992年）を用いてプラスミドを調製した。プローブとして用いたDNA配列の中で塩基配列が決定している部分をもとに作製した配列番号3および配列番号4に示す塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、上記プラスミドを鋳型として上記の条件でPCRを行い、このプライマーを用いてブレヴィバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869の染色体を鋳型としてPCRを行った時に増幅されるDNA断片と同じ約1.3キロベースの大きさの増幅断片が得られるプラスミドを保持する形質転換体を選択した。

【0043】

(2) ブレヴィバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 gltBD遺伝子を含むDNA断片の全塩基配列の決定及びABCトランスポーター遺伝子の単離

上記(1)により得られた形質転換体からアルカリ法により調製したプラスミドDNAは、ブレヴィバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869染色体由来の約14キロベースのDNA断片を含んでいた。上記の方法と同様にして、得られたプラスミドのブレヴィバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869染色体由来の約14キロベースのDNA断片の全塩基配列決定を行った。その結果、得られたDNA断片中には、gltBD遺伝子の全長が含まれていたが、500bp以上のオープン・リーディング・フレームがgltBD遺伝子の

下流に末端から逆向きに2個存在し、これらのオープン・リーディング・フレームの下流にはターミネーターと推定される配列も存在することが明らかとなった。ただし、このオープン・リーディング・フレームは、プロモーター領域が欠けていたので、この上流部分を、下記のようにしてクローニングを行った。

【0044】

ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 染色体を制限酵素BamHIで消化したDNA断片から、配列表配列番号5および配列番号6に示したプライマーを使い、LA PCR in vitro cloning Kit (宝酒造製) を用いてクローニングを行った。上記プライマーを用いてPCRを行った結果、約1.8キロベースのDNA断片が増幅されたので、このDNA断片を上記と同様の方法での塩基配列の決定を行った。その結果、増幅されたDNA断片には、上記の2つのオープン・リーディング・フレームの上流に位置する、約350アミノ酸のオープン・リーディング・フレームが含まれており、さらにその上流にはプロモーター領域と推定される領域が存在することも明らかとなった。したがって、この3つのオープン・リーディング・フレームは、オペロンである可能性がある。

【0045】

これらのオープン・リーディング・フレームの塩基配列は、配列表配列番号7に示す通りである。配列表配列番号7の配列には、その塩基配列から推定される産物のアミノ酸配列も示した。このうち、塩基番号1～1101が1番目のオープン・リーディング・フレームで、1117～1725が2番目のオープン・リーディング・フレームで、さらに1759～2367が3番目のオープン・リーディング・フレームである。なお、それぞれのオープン・リーディング・フレームによりコードされるタンパク質のN末端にあるメチオニン残基は開始コドンであるATGに由来するため、タンパク質本来の機能とは無関係であることが多く、翻訳後ペプチダーゼの働きにより除去されることがよく知られており、上記の各タンパク質の場合にもメチオニン残基の除去が生じている可能性がある。また、ここで推定されたプロモーター領域やターミネーター配列は、あくまでもコンピューターを使った解析の結果であるので、実際にはこの上流もしくは下流にオープン・リーディング・フレームが存在し、それらも一緒に発現している可能性もある。

【0046】

塩基配列、アミノ酸配列おののおについて既知の配列と相同性比較を行った。
 用いたデータベースは、EMBLおよびSWISS-PROTである。その結果、配列表配列番号7に示されるDNAおよびそれにコードされる各タンパク質は、コリネバクテリウム属細菌では新規の遺伝子及びタンパク質であることが明らかとなった。このうち2番目のオープン・リーディング・フレームおよびそれにコードされるタンパク質は、すでに報告されているABCトランスポーターのATP結合タンパク質及びそれをコードする遺伝子と相同性が高く、コリネバクテリウム属細菌では新規なATP結合タンパク質をコードする遺伝子であることが判明した。

【0047】

【発明の効果】

本発明により、*ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム*のABCトランスポーターの構成成分、及びそれらをコードするDNAが提供される。本発明の遺伝子は、コリネ型細菌の育種に利用することができる。

【0048】

【配列表】

Sequence Listing

【0049】

- <110> 味の素株式会社(Ajinomoto Co., Inc.)
- <120> ABCトランスポーター及びそれをコードする遺伝子
- <130> P-6003
- <141> 1998-12-18
- <160> 10
- <170> PatentIn Ver. 2.0

【0050】

- <210> 1
- <211> 17
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> (3,9,12)

<223> n=a or c or g or t

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying Brevibacterium lactofermentum gltBD gene

<400> 1

ggngarggng gngarga_

17

[0 0 5 1]

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> (1,4,7,)

<223> n=a or c or g or t

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying Brevibacterium lactofermentum gltBD gene

<400> 2

nccnccngtc atrtaytc

18

[0 0 5 2]

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying Brevibacterium lactofermentum gltBD gene

<400> 3

aatccacgtg aagctagtgg cagaacaagg cg

32

[0053]

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying Brevibacterium lactofermentum gltBD gene

<400> 4

acgaatgaac aattcaccac tggttgcgcc

30

[0054]

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying downstream region of gltBD gene

<400> 5

atcctcgaca aggatctgtc cg

22

[0055]

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
amplifying downstream region of gltBD gene

<400> 6

ggtttgtaa gtgtgccaag acagttgagc

30

[0056]

<210> 7

<211> 2370

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1101)

<220>

<221> CDS

<222> (1117)..(1725)

<220>

<221> CDS

<222> (1759)..(2367)

<400> 7

atg ctg gcg acc cga cta att acc ttg ttc ttt ttc cta gga atc att

48

Met Leu Ala Thr Arg Leu Ile Thr Leu Phe Phe Phe Leu Gly Ile Ile

1

5

10

15

gga tcg cta acc ggt aac ctc agt gaa cta cgt gca caa act act ttt

96

Gly Ser Leu Thr Gly Asn Leu Ser Glu Leu Arg Ala Gln Thr Thr Phe

20

25

30

agt aca tta tgg gat acc cat aaa gaa acc tat aga gtc tcc ata gct

144

Ser Thr Leu Trp Asp Thr His Lys Glu Thr Tyr Arg Val Ser Ile Ala

35

40

45

tcc gca gca gga caa gac ttc tac ggg ctt gct gag act cta cgc act	192
Ser Ala Ala Gly Gln Asp Phe Tyr Gly Leu Ala Glu Thr Leu Arg Thr	
50 55 60	
atg gat agg cat ggg gaa att att ttg gca gat cgt caa tgg tta aca	240
Met Asp Arg His Gly Glu Ile Ile Leu Ala Asp Arg Gln Trp Leu Thr	
65 70 75 80	
gct ccc ctt gat atc ggt gca cca gtc gta tta tca aac aca act ttt	288
Ala Pro Leu Asp Ile Gly Ala Pro Val Val Leu Ser Asn Thr Thr Phe	
85 90 95	
gcc gtt gat gaa gga cta ctt gcg cca aaa gat cta ccg caa agt gac	336
Ala Val Asp Glu Gly Leu Leu Ala Pro Lys Asp Leu Pro Gln Ser Asp	
100 105 110	
gag atc aca ata ttg cat cct cag ttt ctg gat tcg gcc aaa gag cca	384
Glu Ile Thr Ile Leu His Pro Gln Phe Leu Asp Ser Ala Lys Glu Pro	
115 120 125	
gaa tta ctt ggt ttg ctg gag ttc gaa gca tcc aac tca caa gtg cca	432
Glu Leu Leu Gly Leu Leu Glu Phe Glu Ala Ser Asn Ser Gln Val Pro	
130 135 140	
atg cca aag atc caa agc att cca tat gat agc gaa gac tca acc aac	480
Met Pro Lys Ile Gln Ser Ile Pro Tyr Asp Ser Glu Asp Ser Thr Asn	
145 150 155 160	
ccc atg tct gaa gtt ttt acc tac aac att aac ctg gat agt gca gta	528
Pro Met Ser Glu Val Phe Thr Tyr Asn Ile Asn Leu Asp Ser Ala Val	
165 170 175	
aga aac cca atc gta gtt atc ctt ccc gca ggc tta gag ctt tta agt	576
Arg Asn Pro Ile Val Val Ile Leu Pro Ala Gly Leu Glu Leu Leu Ser	
180 185 190	
gat caa aat ttg tcg gct cga ctc aca cag aat agt ctg ctg ata aaa	624
Asp Gln Asn Leu Ser Ala Arg Leu Thr Gln Asn Ser Leu Leu Ile Lys	

195	200	205	
gac cag act ggt gtg aac gct ctt cta tcc tca gag gat tca cgc aat			672
Asp Gln Thr Gly Val Asn Ala Leu Leu Ser Ser Glu Asp Ser Arg Asn			
210	215	220	
tat gtg gga gct gca tcc ccg atg att gac acg tgg gaa gaa agc gtt			720
Tyr Val Gly Ala Ala Ser Pro Met Ile Asp Thr Trp Glu Glu Ser Val			
225	230	235	240
gtt cgg ttg aag gaa gcg aac caa ata atc gcc ttc aac gct ttc att			768
Val Arg Leu Lys Glu Ala Asn Gln Ile Ile Ala Phe Asn Ala Phe Ile			
245	250	255	
gca ttg ttc ctc acg acg act ctt gtt cta gca tac tgc act ggt att			816
Ala Leu Phe Leu Thr Thr Thr Leu Val Leu Ala Tyr Cys Thr Gly Ile			
260	265	270	
tca ttt aag aaa tca aag aag act atg ggt agc gca tct act agg aaa			864
Ser Phe Lys Lys Ser Lys Lys Thr Met Gly Ser Ala Ser Thr Arg Lys			
275	280	285	
tca tcc att aag agc tcg att aca gct gct aat tgt aga agt aat ttt			912
Ser Ser Ile Lys Ser Ser Ile Thr Ala Ala Asn Cys Arg Ser Asn Phe			
290	295	300	
cgc ttc aat tcc gtg cgt ctg gct cgc gaa ccg cta ttt cga gcg atc			960
Arg Phe Asn Ser Val Arg Leu Ala Arg Glu Pro Leu Phe Arg Ala Ile			
305	310	315	320
tgc agc aat agc ttc aga tgc tcc ctc agc cag ata ctt aga aca tct			1008
Cys Ser Asn Ser Phe Arg Cys Ser Leu Ser Gln Ile Leu Arg Thr Ser			
325	330	335	
caa ttc tat acc tcc atc act gcc gtt ggt ttt agg aat ctt aat aat			1056
Gln Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Ala Val Gly Phe Arg Asn Leu Asn Asn			
340	345	350	
cgg ttg gac ttc act ttc att ttt cag ttc gat gaa gct tcc ttt			1101

Arg	Leu	Asp	Phe	Thr	Phe	Ile	Phe	Gln	Phe	Asp	Glu	Ala	Ser	Phe	
355				360				365							
tgaaaagagc acaca atg ata gaa atc aat gac ctc aag aaa tct ttt ggc														1152	
Met Ile Glu Ile Asn Asp Leu Lys Lys Ser Phe Gly															
1				5				10							
gtt cgg atc tta tgg caa ggt ctc agt cat aag ttt tta cca gga aca														1200	
Val Arg Ile Leu Trp Gln Gly Leu Ser His Lys Phe Leu Pro Gly Thr															
15				20				25							
atg aca gca ctg act gga gcg tcc ggt tca gga aaa tcg act ttg ctc														1248	
Met Thr Ala Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu															
30				35				40							
aac tgt ctt ggc aca ctt gac aaa cca agt tcc gga cag atc ctt gtc														1296	
Asn Cys Leu Gly Thr Leu Asp Lys Pro Ser Ser Gly Gln Ile Leu Val															
45				50				55				60			
gag gat gta gac ctt ctg aaa ctc tct acg cgt aag caa cgg tta tac														1344	
Glu Asp Val Asp Leu Leu Lys Leu Ser Thr Arg Lys Gln Arg Leu Tyr															
65				70				75							
agg aaa aat acg gtg ggc tat tta ttt caa gat tat gcc ttg att ccc														1392	
Arg Lys Asn Thr Val Gly Tyr Leu Phe Gln Asp Tyr Ala Leu Ile Pro															
80				85				90							
gac agg aca gtt aaa ttc aac ctt cag ctt gcg gtg gaa aaa cac aaa														1440	
Asp Arg Thr Val Lys Phe Asn Leu Gln Leu Ala Val Glu Lys His Lys															
95				100				105							
tgg cct gaa att cct caa gta ctt cat gct gtt ggt ctt gag tcg ttc														1488	
Trp Pro Glu Ile Pro Gln Val Leu His Ala Val Gly Leu Glu Ser Phe															
110				115				120							
gag gaa aag cca gtt ttt gaa ctc tct ggt ggc gaa caa caa cga act														1536	
Glu Glu Lys Pro Val Phe Glu Leu Ser Gly Gly Glu Gln Gln Arg Thr															
125				130				135				140			

gcg ttg gcc cgg gta ctg ctc aaa aat ccc cga ata att ctg gct gat	1584
Ala Leu Ala Arg Val Leu Leu Lys Asn Pro Arg Ile Ile Leu Ala Asp	
145 150 155	
gaa cca acc gga gct cta gat tta aca aac agt gag cta gtc ata gaa	1632
Glu Pro Thr Gly Ala Leu Asp Leu Thr Asn Ser Glu Leu Val Ile Glu	
160 165 170	
gca ttg aga gca ctc gcc gac aaa ggc gcc acc gtt gtt gtt gct acg	1680
Ala Leu Arg Ala Leu Ala Asp Lys Gly Ala Thr Val Val Val Ala Thr	
175 - 180 185	
cac tcg ccc ctc ttc cga gaa tca gcg gat acc att atc aaa cta	1725
His Ser Pro Leu Phe Arg Glu Ser Ala Asp Thr Ile Ile Lys Leu	
190 195 200	
taggtgcccc aacttttcgg agatctcagt gca atg atg gaa ttc tta aac act	1779
Met Met Glu Phe Leu Asn Thr	
1 5	
cac cgt ttg att gtt ctc ggg agt ttg tct ttt cta ggg cta ggt ttc	1827
His Arg Leu Ile Val Leu Gly Ser Leu Ser Phe Leu Gly Leu Gly Phe	
10 15 20	
gcg gaa gtc ctg ctg cgt ggc cag tgg tca aca ccg cag ttt ttt gtt	1875
Ala Glu Val Leu Leu Arg Gly Gln Trp Ser Thr Pro Gln Phe Phe Val	
25 30 35	
ttc act ttc ttg caa act ctg ctt ctc gta ttg tgt ttt att cct aaa	1923
Phe Thr Phe Leu Gln Thr Leu Leu Leu Val Leu Cys Phe Ile Pro Lys	
40 45 50 55	
ctc tcg gtt cct ttt gtg gtg ctt cta agc att gcc caa ctc gcg ctt	1971
Leu Ser Val Pro Phe Val Val Leu Leu Ser Ile Ala Gln Leu Ala Leu	
60 65 70	
gca tag ctg tgt att cat ggt gaa cct caa agc acc agc cct ttc act	2019
Ala Tyr Leu Cys Ile His Gly Glu Pro Gln Ser Thr Ser Pro Phe Thr	

75	80	85	
tta att gtt gcc caa atg gcg ttt tcg gga ttg ctc atg ttc aga ggg			2067
Leu Ile Val Ala Gln Met Ala Phe Ser Gly Leu Leu Met Phe Arg Gly			
90	95	100	
caa cgg gtg ctc gct ttt atc tct gca ggt ggg ctc att tgg att ggg			2115
Gln Arg Val Leu Ala Phe Ile Ser Ala Gly Gly Leu Ile Trp Ile Gly			
105	110	115	
acc atc gat cca aca aac ggt gct tgg tct cct cat gtg atg tcc gcg			2163
Thr Ile Asp Pro Thr Asn Gly Ala Trp Ser Pro His Val Met Ser Ala			
120	125	130	135
cta gca ctt gcc gta ttc ttt gcg ctg tcg atg gca ctt gga cag gtt			2211
Leu Ala Leu Ala Val Phe Phe Ala Leu Ser Met Ala Leu Gly Gln Val			
140	145	150	
ctt cga tca aaa gtt gaa caa aga gcc aac ctt gag gag cag gca aaa			2259
Leu Arg Ser Lys Val Glu Gln Arg Ala Asn Leu Glu Glu Gln Ala Lys			
155	160	165	
att cag aca gaa ctg cgc aga aaa gaa cta agc act cca tct gca tcg			2307
Ile Gln Thr Glu Leu Arg Arg Lys Glu Leu Ser Thr Pro Ser Ala Ser			
170	175	180	
gtc ggt tgc caa aga act tac gtt tgc agt gat gaa atc gca gga gct			2355
Val Gly Cys Gln Arg Thr Tyr Val Cys Ser Asp Glu Ile Ala Gly Ala			
185	190	195	
cag tgg tcg cga taa			2370
Gln Trp Ser Arg			
200			
[0 0 5 7]			
<210> 8			
<211> 367			
<212> PRT			

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 8

Met Leu Ala Thr Arg Leu Ile Thr Leu Phe Phe Phe Leu Gly Ile Ile
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Thr Gly Asn Leu Ser Glu Leu Arg Ala Gln Thr Thr Phe
 20 25 30
 Ser Thr Leu Trp Asp Thr His Lys Glu Thr Tyr Arg Val Ser Ile Ala
 35 40 45
 Ser Ala Ala Gly Gln Asp Phe Tyr Gly Leu Ala Glu Thr Leu Arg Thr
 50 55 60
 Met Asp Arg His Gly Glu Ile Ile Leu Ala Asp Arg Gln Trp Leu Thr
 65 70 75 80
 Ala Pro Leu Asp Ile Gly Ala Pro Val Val Leu Ser Asn Thr Thr Phe
 85 90 95
 Ala Val Asp Glu Gly Leu Leu Ala Pro Lys Asp Leu Pro Gln Ser Asp
 100 105 110
 Glu Ile Thr Ile Leu His Pro Gln Phe Leu Asp Ser Ala Lys Glu Pro
 115 120 125
 Glu Leu Leu Gly Leu Leu Glu Phe Glu Ala Ser Asn Ser Gln Val Pro
 130 135 140
 Met Pro Lys Ile Gln Ser Ile Pro Tyr Asp Ser Glu Asp Ser Thr Asn
 145 150 155 160
 Pro Met Ser Glu Val Phe Thr Tyr Asn Ile Asn Leu Asp Ser Ala Val
 165 170 175
 Arg Asn Pro Ile Val Val Ile Leu Pro Ala Gly Leu Glu Leu Leu Ser
 180 185 190
 Asp Gln Asn Leu Ser Ala Arg Leu Thr Gln Asn Ser Leu Leu Ile Lys
 195 200 205
 Asp Gln Thr Gly Val Asn Ala Leu Leu Ser Ser Glu Asp Ser Arg Asn

210	215	220	
Tyr Val Gly Ala Ala Ser Pro Met Ile Asp Thr Trp Glu Glu Ser Val			
225	230	235	240
Val Arg Leu Lys Glu Ala Asn Gln Ile Ile Ala Phe Asn Ala Phe Ile			
	245	250	255
Ala Leu Phe Leu Thr Thr Thr Leu Val Leu Ala Tyr Cys Thr Gly Ile			
	260	265	270
Ser Phe Lys Lys Ser Lys Lys Thr Met Gly Ser Ala Ser Thr Arg Lys			
275	280	285	
Ser Ser Ile Lys Ser Ser Ile Thr Ala Ala Asn Cys Arg Ser Asn Phe			
290	295	300	
Arg Phe Asn Ser Val Arg Leu Ala Arg Glu Pro Leu Phe Arg Ala Ile			
305	310	315	320
Cys Ser Asn Ser Phe Arg Cys Ser Leu Ser Gln Ile Leu Arg Thr Ser			
	325	330	335
Gln Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Ala Val Gly Phe Arg Asn Leu Asn Asn			
	340	345	350
Arg Leu Asp Phe Thr Phe Ile Phe Gln Phe Asp Glu Ala Ser Phe			
355	360	365	

[0058]

<210> 9

<211> 203

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 9

Met Ile Glu Ile Asn Asp Leu Lys Lys Ser Phe Gly Val Arg Ile Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Trp Gln Gly Leu Ser His Lys Phe Leu Pro Gly Thr Met Thr Ala Leu

20	25	30
----	----	----

Thr Gly Ala Ser Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu Asn Cys Leu Gly
35 40 45
Thr Leu Asp Lys Pro Ser Ser Gly Gln Ile Leu Val Glu Asp Val Asp
50 55 60
Leu Leu Lys Leu Ser Thr Arg Lys Gln Arg Leu Tyr Arg Lys Asn Thr
65 70 75 80
Val Gly Tyr Leu Phe Gln Asp Tyr Ala Leu Ile Pro Asp Arg Thr Val
85 90 95
Lys Phe Asn Leu Gln Leu Ala Val Glu Lys His Lys Trp Pro Glu Ile
100 105 110
Pro Gln Val Leu His Ala Val Gly Leu Glu Ser Phe Glu Glu Lys Pro
115 120 125
Val Phe Glu Leu Ser Gly Gly Glu Gln Gln Arg Thr Ala Leu Ala Arg
130 135 140
Val Leu Leu Lys Asn Pro Arg Ile Ile Leu Ala Asp Glu Pro Thr Gly
145 150 155 160
Ala Leu Asp Leu Thr Asn Ser Glu Leu Val Ile Glu Ala Leu Arg Ala
165 170 175
Leu Ala Asp Lys Gly Ala Thr Val Val Val Ala Thr His Ser Pro Leu
180 185 190
Phe Arg Glu Ser Ala Asp Thr Ile Ile Lys Leu
195 200

[0059]

<210> 10

<211> 203

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 10

Met Met Glu Phe Leu Asn Thr His Arg Leu Ile Val Leu Gly Ser Leu

1	5	10	15
Ser Phe Leu Gly Leu Gly Phe Ala Glu Val Leu Leu Arg Gly Gln Trp			
20	25	30	
Ser Thr Pro Gln Phe Phe Val Phe Thr Phe Leu Gln Thr Leu Leu Leu			
35	40	45	
Val Leu Cys Phe Ile Pro Lys Leu Ser Val Pro Phe Val Val Leu Leu			
50	55	60	
Ser Ile Ala Gln Leu Ala Leu Ala Tyr Leu Cys Ile His Gly Glu Pro			
65	70	75	80
Gln Ser Thr Ser Pro Phe Thr Leu Ile Val Ala Gln Met Ala Phe Ser			
85	90	95	
Gly Leu Leu Met Phe Arg Gly Gln Arg Val Leu Ala Phe Ile Ser Ala			
100	105	110	
Gly Gly Leu Ile Trp Ile Gly Thr Ile Asp Pro Thr Asn Gly Ala Trp			
115	120	125	
Ser Pro His Val Met Ser Ala Leu Ala Leu Ala Val Phe Phe Ala Leu			
130	135	140	
Ser Met Ala Leu Gly Gln Val Leu Arg Ser Lys Val Glu Gln Arg Ala			
145	150	155	160
Asn Leu Glu Glu Gln Ala Lys Ile Gln Thr Glu Leu Arg Arg Lys Glu			
165	170	175	
Leu Ser Thr Pro Ser Ala Ser Val Gly Cys Gln Arg Thr Tyr Val Cys			
180	185	190	
Ser Asp Glu Ile Ala Gly Ala Gln Trp Ser Arg			
195	200		

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質及びそれをコードする DNA。

(A) 配列表の配列番号 8、9 又は 10 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 8、9 又は 10 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABC トランスポーターを構成するタンパク質。

【効果】 プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの ABC トランスポーターの構成成分及びそれらをコードする DNA が提供される。本発明の DNA は、コリネ型細菌の育種に利用することができる。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000000066

【住所又は居所】

東京都中央区京橋1丁目15番1号

【氏名又は名称】

味の素株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100089244

【住所又は居所】

東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ
ビル6階 秀和特許法律事務所

【氏名又は名称】

遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】

100090516

【住所又は居所】

東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ
ビル6階 秀和特許法律事務所

【氏名又は名称】

松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】

100100549

【住所又は居所】

東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ
ビル6階 秀和特許法律事務所

【氏名又は名称】

川口 嘉之

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名 味の素株式会社